

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 9 月 26 日 (26.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/074962 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/13, C07K 16/44, C12P 21/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/02330

(22) 国際出願日: 2002 年 3 月 13 日 (13.03.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-074263 2001 年 3 月 15 日 (15.03.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY
CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市
本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 株式会社ジャパン
エナジー (JAPAN ENERGY CORPORATION) [JP/JP];
〒105-8407 東京都 港区 虎ノ門 2-1 0-1 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小松 靖彦

(KOMATSU, Yasuhiko) [JP/JP]; 〒362-0042 埼玉県 上
尾市 谷津 2-1-1 A-1 0 5 Saitama (JP). 吉田 稔
(YOSHIDA, Minoru) [JP/JP]; 〒334-0059 埼玉県 川口
市 安行 6 5 5-2 1 Saitama (JP).

(74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都
中央区 日本橋三丁目 1 5 番 2 号 高愛ビル 9 階 Tokyo
(JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ACETYLLYSINE-RECOGNIZING MONOCLONAL ANTIBODY AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: アセチルリジン認識モノクローナル抗体及びその製造方法

(57) Abstract: Anti-acetyllysine monoclonal antibody capable of recognizing N ϵ -acetyllysine regardless of the types of the adjacent amino acids. Namely, a monoclonal antibody having a light chain comprising a constant region having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and a variable region having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 or an amino acid sequence derived from this amino acid sequence by deletion, substitution or addition of one to several amino acids, and a heavy chain comprising a constant region having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 and a variable region having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 or an amino acid sequence derived from this amino acid sequence by deletion, substitution or addition of one to several amino acids, and being capable of recognizing N ϵ -acetyllysine in a protein regardless of the types of the adjacent amino acids, i.e., being capable of accepting adjacent amino acids over a broad range; and a process for producing this monoclonal antibody characterized by using a chemically acetylated protein as an antigen.

[続葉有]

WO 02/074962 A1



(57) 要約:

隣接のアミノ酸の種類に依存せずにNε-アセチルリジン残基を認識し得る抗アセチルリジンモノクローナル抗体とその製造法の提供。

軽鎖が、不変領域が配列番号：1に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：2に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものであって、且つ、重鎖が、不変領域が配列番号：3に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：4に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、蛋白質中のNε-アセチルリジンを認識するに際し、隣接のアミノ酸の種類に特に依存せず広範囲の隣接アミノ酸を許容し得るモノクローナル抗体と、化学的にアセチル化した蛋白質を抗原として用いることを特徴とする該モノクローナル抗体の製造方法。

明 細 書

アセチルリジン認識モノクローナル抗体及びその製造方法

技術分野

本発明は新規なモノクローナル抗体及びその製造方法に関する。詳しくは、隣接のアミノ酸の種類に依存せずに蛋白質中のN^ε-アセチルリジン残基を認識し得るモノクローナル抗体とその製造方法に関する。

背景技術

近年真核生物の遺伝子発現制御においてコアヒストンのN末端領域のリジン残基のN^ε-アセチル化が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。そのアセチル化を担う酵素であるヒストンアセチルトランスフェラーゼ及び脱アセチル化を担う酵素であるヒストンデアセチラーゼは1996年に初めてクローニングされたが、その後同活性を有する分子が複数見出されてきている。また、近年ではヒストン以外にp53、TCF、HMG-1等種々の非ヒストン蛋白質がアセチル化を受けることが明らかにされてきており、アセチル化はリン酸化に匹敵する広範な役割を果たす翻訳後修飾である可能性が指摘されるようになった。

上記の様な未知の新規アセチル化蛋白質を検索するためにはN^ε-アセチルリジン残基を特異的にかつ隣接アミノ酸のいかんを問わず認識するプローブ分子が有用であることは論を待たない。その様な目的に最もかなった分子としては抗体が考えられるが、これまでに隣接アミノ酸の種類によらず様々な状況下のアセチルリジンを認識できる抗体はほとんど報告されていなかった。

発明の開示

本発明は上記した如き現状に鑑みなされたもので、隣接のアミノ酸の種類に特に依存せず広範囲の隣接アミノ酸を許容し得る、N^ε-アセチルリジン認識抗アセチルリジンモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、広範囲の隣接アミノ酸を許容する抗アセチルリジンモノクローナル抗体を作製することに成功した。また、作製したモノクローナル抗体の可変領域のcDNA配列を決定することにより、作製した抗体が互いに類似した構造上の特徴を有していることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、N^ε-アセチルリジンを認識するモノクローナル抗体に関する。詳しくは、蛋白質中のN^ε-アセチルリジンを認識するに際し、隣接のアミノ酸の種類に特に依存せず広範囲の隣接アミノ酸を許容し得る、該モノクローナル抗体に関する。

更に詳しくは、(1) 軽鎖が、不変領域が配列番号：1に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：2に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものであって、且つ、(2) 重鎖が、不変領域が配列番号：3に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：4に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、該モノクローナル抗体に関する。

また、本発明は、化学的にアセチル化した蛋白質を抗原として用いることを特徴とする該モノクローナル抗体の製造方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体の種々のアセチルリジン含有ペプチドに対する反応性の比較(ELISA法)を示したものである。

第2図は、本発明の4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体による、種々の細胞の総細胞ライセート中のアセチル化蛋白質の検出結果を示す図面である。

第3図は、本発明の4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体のELISA反応性がN^ε-アセチルリジン及びN^ε-アセチルリジンで競合されるかどうかを調べた結果を示す。

第4図は、本発明の4種の抗アセチルリジンモノクローナル抗体の重鎖及び軽

鎖可変領域のアミノ酸配列を比較した結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のモノクローナル抗体において、軽鎖の可変領域が、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるものとしては、例えば、配列番号：5、配列番号：6又は配列番号：7等に記載のアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

また、本発明のモノクローナル抗体において、重鎖の可変領域が、配列番号：4に記載されたアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるものとしては、例えば、配列番号：8に記載のアミノ酸配列を有するもの等が、1若しくは数個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列からなるものとしては、例えば、配列番号：9に記載のアミノ酸配列を有するもの等が、また、1若しくは数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列からなるものとしては、例えば、配列番号：10に記載のアミノ酸配列を有するもの等が、それぞれ挙げられる。

本発明のモノクローナル抗体は、N⁺-アセチルリジンを認識する抗体であって、且つ、蛋白質中に存在するN⁺-アセチルリジン残基を認識する際に、隣接のアミノ酸の種類に特に依存せず、広範な隣接アミノ酸を許容するという性質を有するが、これらの抗体はアセチルリジンを含む様々な分子を抗原に用いることにより製造することができる。特に優れた性質の抗体は、複数のリジン残基を持つ蛋白質を化学的にアセチル化したものを抗原として用いる作製方法によりもたらされる。

本発明の抗体は、例えばアセチルリジンを含む合成ペプチドをムラサキカサガイヘモシアニン等のキャリアー蛋白質に結合させたもの、あるいは複数のリジン残基を化学的にアセチル化した蛋白質、例えば無水酢酸でアセチル化したムラサキカサガイヘモシアニンを抗原として用いて動物、例えばマウスを免疫し、得られた抗体産生細胞、例えば脾臓細胞を、例えばミエローマ細胞と融合させることにより不死化することにより得られる抗体産生不死化細胞により産生される。

上記抗原分子の内、分子中に複数のリジン残基を含む蛋白質を化学的にアセチ

ル化したものを用いる方法は単一のリジン残基を含むペプチドを抗原とした方法よりもより好ましい。従って、優れた抗体を得るために多種類のアセチルリジン含有ペプチドの混合物を用いることが好ましいことは容易に想像できる。

また、別の方法として、例えばファージにディスプレイされた抗体ライブラリーを抗原とのアフィニティーによりスクリーニングする様な方法により抗体産生細胞を得ることもできる。

この様な抗体産生不死化細胞を得るためには従来から使用されているモノクローナル抗体産生技術及び将来開発される新たなモノクローナル抗体産生技術とともに全て利用出来る。

抗体産生細胞のスクリーニングは複数のリジン残基をアセチル化した抗原とは異なる蛋白質、例えばアセチル化ウシ血清アルブミンや種々の隣接アミノ酸を有するアセチルリジン含有ペプチドを用いて、なるべく多くの隣接アミノ酸を許容する抗体を産生するクローンを選別することにより行うことができる。また、産生された抗体分子は、アセチルリジンを固相化したアフィニティーカラムや、プロテインAを用いたアフィニティーカラムにより精製できる。

産生された抗体が本発明の抗体であるかどうかは、抗体産生不死化細胞の抗体遺伝子の可変領域のDNA配列を解析し、それを蛋白質に翻訳した際の配列的特徴が上記配列に高度に類似するかどうかで判断できる。

また、本発明は前記してきた本発明のN^ε-アセチルリジンを認識するモノクローナル抗体をコードする遺伝子、好ましくはDNAを提供するものでもある。本発明のDNAの例を配列表の配列番号11～18に示す。配列番号の11～14は軽鎖に関するものであり、配列番号15～18は重鎖に関するものである。本発明のDNAはこれらの相補鎖又はこれらの塩基配列にストリージェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を包含している。

本発明のモノクローナル抗体は、感作動物としてマウス、ラット、ウサギ、イヌなどの各種の哺乳動物や、ニワトリなどの鳥類などを使用することもできる。また、本発明のモノクローナル抗体の可変領域及び／又は超可変領域をもちいてキメラ抗体やヒト型抗体にすることもできる。

実施例

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

実施例 1. 抗N^ε-アセチルリジンモノクローナル抗体の作製

表 1 に記載の三種類の免疫用抗原及びスクリーニング用抗原の組み合わせで抗N^ε-アセチルリジンモノクローナル抗体の作製を行った。なお、ウシ血清アルブミン及びムラサキカサガイヘモシアニンのアセチル化は、無水酢酸を用いて以下の方法で行った。10mgの蛋白質を1mlのホウ酸緩衝液(20mM Na₂B₄O₇, pH9.3)に溶解し、氷冷下、250μmolの無水酢酸(約22.6μl)と500μlの1M NaOHを加え、30分間時々かき混ぜながらインキュベートした。反応終了後、G-25ゲルろ過(PD-10, フェルマシア社)を用いて溶媒交換して、アセチル化蛋白質のリン酸緩衝液(PBS)溶液を得た。

表 1

	免疫用抗原	スクリーニング用抗原
ケース 1	ヒストン H4 N 末ペプチド をアセチル化したものと ムラサキカサガイヘモシ アニンのコンジュゲート	ヒストン H3 N 末ペプチド をアセチル化したもの
ケース 2	ヒストン H4 N 末ペプチド をアセチル化したものと ムラサキカサガイヘモシ アニンのコンジュゲート	ウシ血清アルブミンを無 水酢酸でアセチル化した もの
ケース 3	ムラサキカサガイヘモシ アニンを無水酢酸でアセ チル化したもの	ウシ血清アルブミンを無 水酢酸でアセチル化した もの、及びアセチル化ペプ チド

免疫はB a l b / c マウスのメスにて行い、一週間ごとに三回、一回目はフロインド完全アジュバントを、二回目及び三回目はフロインド不完全アジュバントを用いて、背部皮下に行った。免疫量は0.1mg / マウスである。

免疫が成立したマウスから、常法を用いて抗アセチルリジンモノクローナル抗

体を産生するハイブリドーマのクローニングを行った。その結果、ケース 1 からクローナー 1、ケース 2 からクローナー 2、ケース 3 からクローナー 3 及びクローナー 4 の計 4 クローンをそれぞれ樹立できた。E L I S A プレート（岩城硝子、AquaBind plate）に C 末システインを介して共有結合した種々のアセチルリジン含有ペプチドを用いて、それらに対する反応性を比較した結果を第 1 図に示した。第 1 図中、A はクローナー 1、B はクローナー 2、C はクローナー 3、D はクローナー 4 の結果をそれぞれ示す。各グラフの右には吸光度 0.5 を与える時の各抗体の濃度を記してある。なお、図中使用されたペプチドの一覧は以下の表 2 に示すとおりである。第 1 図に示されるように、クローナー 1 ～ 4 のいずれの抗体も様々な隣接アミノ酸が存在する条件下でアセチルリジンに対して結合反応性を示すことが判った。この実験からは、特にクローナー 2 ～ 4 の三つが今回調べたペプチドのいずれともほぼ同程度の反応性を示し、隣接アミノ酸を広く許容することが明らかになった。

また、抗体のアイソタイプを決定した結果、いずれも I g G 1 κ であることを確認した。

表 2

ペプチドの名称	アミノ酸配列
H2A-5-GKQ	SGRGK(Ac)QGGKC
H2B-5-AKS	PEPAK(Ac)SAPAC
H2B-12-KKG	PAPKK(Ac)GSKKC
H2B-15-SKK	KKGSK(Ac)KAVTC
H3-9-RKS	TARK(Ac)STGGKAC
H3-14-GKA	STGCK(Ac)APRKC
H3-18-RKQ	KAPRK(Ac)QLATC
H3-23-TKA	LATK(Ac)AARKSAC
H4-5-GKG	SGRGK(Ac)GGKGLC
H4-16-AKR	KGGAK(Ac)RHRKVC
H4RC	SGRGKGGKGLGKGGAKRHRKVC
p53-320	SPQPKK(Ac)KPLC
p53-373	HLKSKK(Ac)GQSC
p53-382	TSRHKK(Ac)LMFC

名称の右に付加した数字は各蛋白中の該当アセチルリジン残基の位置を示す。H4RC は非アセチル化ペプチドである。なお、表中のアミノ酸配列は一文字表記で表した。

実施例 2. ウェスタンブロッティング法によるアセチル化蛋白質の検出

B16/BL6、MOLT-4F、HeLa-S3、COS-1、及びCOS-7の5種の細胞を1 μ Mのヒストンデアセチラーゼ阻害剤CHAP31で24時間処理した後、細胞ライセートを調製し、電気泳動で展開後、上記4種の抗体を一次抗体として使用して、アセチル化蛋白質の検出を実施した。結果を第2図に示す。第2図中、A、B、C、Dはそれぞれ、クローン-1、クローン-2、クローン-3、及びクローン-4抗体を用いて検出を行った結果を示す。ウェスタンブロッティングに用いた一次抗体の濃度は、それぞれ、107、65.7、258、及び158 ng/mlであり、いずれもアセチル化ウシ血清アルブミンを固相化したELISAにおいて同じ反応性 ($A_{492} = 1$) を与える濃度である。各細胞を1 μ MのCHAP31で24時間処理した後の細胞(+)または無処理の細胞(-)から総細胞ライセートを調製した。各レーンには20 μ gの蛋白質

を乗せた。用いた5種の細胞は1: B16/BL6、2: MOLT-4F、3: HeLa-S3、4: COS-1、及び5: COS-7である。

第2図に示されるように、実施例1のケース1で作製したクローン-1抗体はCHAP31で亢進したヒストンのアセチル化以外検出出来ず、またケース2で作製したクローン-2はヒストン以外に数個の蛋白を検出できるがそれ以外に対する反応性は不十分であったのに対して、ケース3で作製したクローン-3及びクローン-4抗体はMOLT-4F、COS-1、及びCOS-7細胞においてヒストン以外に、50kDa付近の位置のアセチル化蛋白質を強く検出し、更に、MOLT-4F細胞では20kDa付近及び高分子部分の複数の蛋白質を、COS-7細胞では更に多くのアセチル化蛋白質を検出出来ることが分かった。この検討により、ウエスタンブロッティング法によるアセチル化非ヒストン蛋白質の検出には、アセチル化ムラサキカサガイヘモシアニンを抗原として用いたクローン-3及び-4が特に優れていることが確認された。即ち、アセチルリジンの隣接アミノ酸をより広く許容する抗体を作製するためには、アセチル化ムラサキカサガイヘモシアニンに代表される、蛋白質内の複数のリジン残基がアセチル化された分子を抗原として用いることが優れていることが判った。

実施例3. N^ε-アセチルリジンに対する特異性の確認

作製した抗体がN^ε-アセチル化リジンに特異的に反応していることを確かめるために、ELISAプレートにアセチル化ウシ血清アルブミンを固相化し、各抗体のELISA反応性がN^ε-アセチルリジン及びN^α-アセチルリジンで競合されるかどうかを調べた。即ち、1μg/mlのアセチル化ウシ血清アルブミンのリン酸緩衝液(50μl)溶液で一晩4℃で固相化したELISAプレートを用いて、各抗体1μg/mlを反応させる条件でN^ε-アセチルリジン及びN^α-アセチルリジンによる阻害を調べた。結果を第3図に示す。第3図中、●、▲、■及び◆は、N^ε-アセチルリジンによる阻害を、また、○、△、□及び◇は、N^α-アセチルリジンによる阻害を調べた結果をそれぞれ示す。また、●及び○はクローン-1(AL3D5)を用いた場合の結果を、▲及び△はクローン-2(AL11)を用いた場合の結果を、■及び□はクローン-3(AKL3H6)を用

いた場合の結果を、◆及び◇はクローン-4 (AKL 5 C 1) を用いた場合の結果をそれぞれ示す。

第3図から明らかなように、クローン-1～-4のいずれの抗体の反応もN^ε-アセチルリジンによっては競合され反応性が低下したが、N^ε-アセチルリジンでは競合されず、これらの抗体がN^ε-アセチルリジンに特異的に反応していることが明らかになった。

実施例4. 各抗体の可変領域のcDNA及びアミノ酸配列決定

どのような可変領域のアミノ酸配列がAKL 3 H 6及びAKL 5 C 1抗体の上記実施例に示されたような優れた性質を担っているのかを明らかにするために、ハイブリドーマより各抗体のL鎖及びH鎖の可変領域のDNAをクローニングし、その配列を決定した。クローニングは、まずハイブリドーマからQ I A G E N社のR N e a s y M i n i K i tを用いてRNAを単離した後、r a n d o m - 9 m e rをテンプレートとして用いS a w a d y T e c h n o l o g yのT r u e S c r i p t I I R Tを用いて逆転写反応を実施し、更に、5'-プライマーとしてN o v a g e n社のm i xプライマーを、3'-プライマーとして、軽鎖に関しては、5'-A C T G T T C A G G A C G C C A T T T T G T C G T T C A C T - 3'、重鎖に関しては、5'-G G A T C C A G A G T T C C A G G T C A C T G T - 3'をプライマーとして用いてS a w a d y T e c h n o l o g y社のS u p e r T a q 2 x k i tによるPCR法により可変領域cDNAを増幅することにより行った。得られたDNA断片はN o v a g e n社のp T 7 B l u e T - V e c t o rにT a K a R aのD N A L i g a t i o n k i t v e r . 2を用いてライゲートし、それを用いて宝酒造のJ M 1 0 9コンピテントセルをトランスフォームし、X-gal、アンピシリン、IPTG含有プレートに播種後、白いコロニーをピックアップした。正常なサイズのインサートを含むクローン各5種よりプラスミドを調製後、A B I P R I S M 3 1 0型自動シーケンサーを用いてDNA配列を決定した。決定した配列は一部にPCRエラーによると思われる変異が認められた以外は5クローンとも同じ配列を示したので、その配列をもって目的のDNA配列とした。結果を配列番号：11～配列番号：18に

示す。

また、上記のごとく決定したDNA配列を元にしてL鎖及びH鎖のアミノ酸配列を推定した結果を配列番号：19～配列番号：26に示す。

また、第4図には、アミノ酸配列をアラインし、各抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を比較した結果を示す。なお、アミノ酸は一文字表記で表した。また、可変領域中の相補性決定領域を四角で囲って、CDR1～3と明示した。

この図で判る通り、3回の独立の免疫操作により得た4種の抗体は何れも共通のフレームワーク構造を有しており、この共通性がアセチルリジン認識自体に何らかの重要性をもっているものと思われる。一方、実施例1及び2で示したような、抗体間の性質の違いは、ここで示される、配列のわずかな違いに帰着されるはずであるが、立体構造的な情報がない現時点では、どこの部分の差異が抗体のどのような性質の違いをもたらしているのかまでは明らかでない。

産業上の利用可能性

本発明の抗体はアセチルリジンの隣接アミノ酸の種類に余り依存せずアセチルリジンを検出することができるので、既知の種々のアセチル化蛋白質のアセチル化状態を検出するのに有用である。例えば、種々の刺激剤の影響下ヒストンのアセチル化レベルがどう変動するかをウエスタンブロッティング等の方法で容易に検出できる。また、本発明の抗体は同様の理由から未知の新たなアセチルリジン含有蛋白質を検索するのにも非常に有用である。具体的には、本抗体を用いた免疫沈降法や本抗体を固相化したアフィニティーカラムあるいは抗体チップ等を使用することにより、未知の新規なアセチルリジン含有蛋白質を見出せることが予想される。更に、本発明の抗体はモノクローナル抗体であるから、既に樹立された方法により一本鎖抗体に改変可能で、あるいは、エピトープがアセチルリジンと小さいことから、軽鎖または重鎖のいずれか一方のみで活性を持つ可能性もあり、そうならばこれをコードするDNAを用いたツー・ハイブリッド法により、抗体に対するアフィニティーの弱いアセチルリジン含有蛋白質を発見することにも用いることもできる。また、種々の細胞内で発現させることにより、アセチルリジン含有蛋白質の機能解析にも用い得る。更に、将来的に病態と何らかの関連

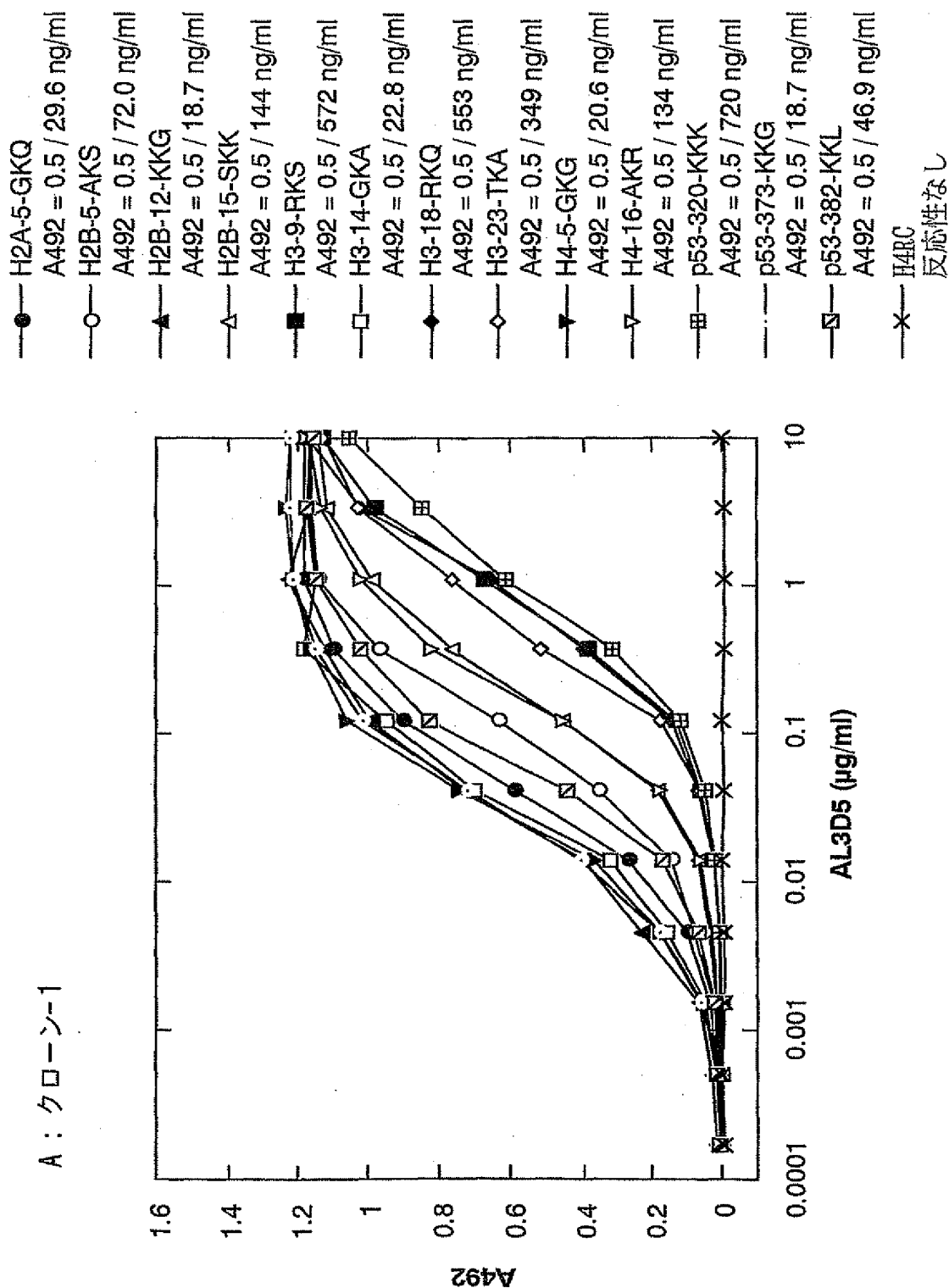
を示すアセチル化蛋白質の存在が明らかになった上は、その診断法を構築する上で重要な役割を果たし得る。

請 求 の 範 囲

1. N^ε-アセチルリジンを認識するモノクローナル抗体。
2. 蛋白質中のN^ε-アセチルリジンを認識するに際し、隣接のアミノ酸の種類に特に依存せず広範囲の隣接アミノ酸を許容し得る、請求の範囲第1項に記載のモノクローナル抗体。
3. モノクローナル抗体が、(1) 軽鎖が、不変領域が配列番号：1に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：2に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものであって、且つ、(2) 重鎖が、不変領域が配列番号：3に記載されたアミノ酸配列からなり、可変領域が配列番号：4に記載されたアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものである請求の範囲第1項又は第2項に記載のモノクローナル抗体。
4. 軽鎖の可変領域が、配列番号：2に記載されたアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列からなるものである請求の範囲第3項に記載のモノクローナル抗体。
5. 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列が、配列番号：5に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第4項に記載のモノクローナル抗体。
6. 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列が、配列番号：6に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第4項に記載のモノクローナル抗体。
7. 配列番号：2に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列が、配列番号：7に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第4項に記載のモノクローナル抗体。
8. 重鎖の可変領域が、配列番号：4に記載されたアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるものである請求の範囲第3項～第7項の何れかに記載のモノクローナル抗体。

9. 配列番号：4に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列が、配列番号：8に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第8項に記載のモノクローナル抗体。
10. 配列番号：4に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列が、配列番号：9に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第8項に記載のモノクローナル抗体。
11. 配列番号：4に記載されたアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列が、配列番号：10に記載されたアミノ酸配列である請求の範囲第8項に記載のモノクローナル抗体。
12. マウスモノクローナル抗体である請求の範囲第1項～第11項の何れかに記載のモノクローナル抗体。
13. 化学的にアセチル化した蛋白質を抗原として用いることを特徴とする請求の範囲第1項～第12項の何れかに記載のモノクローナル抗体の製造方法。
14. 蛋白質が分子内に複数のリジンを有する蛋白質である請求の範囲第13項に記載の製造方法。
15. 化学的にアセチル化した蛋白質がアセチル化したムラサキカサガイヘモシアニンである請求の範囲第13項に記載の製造方法。

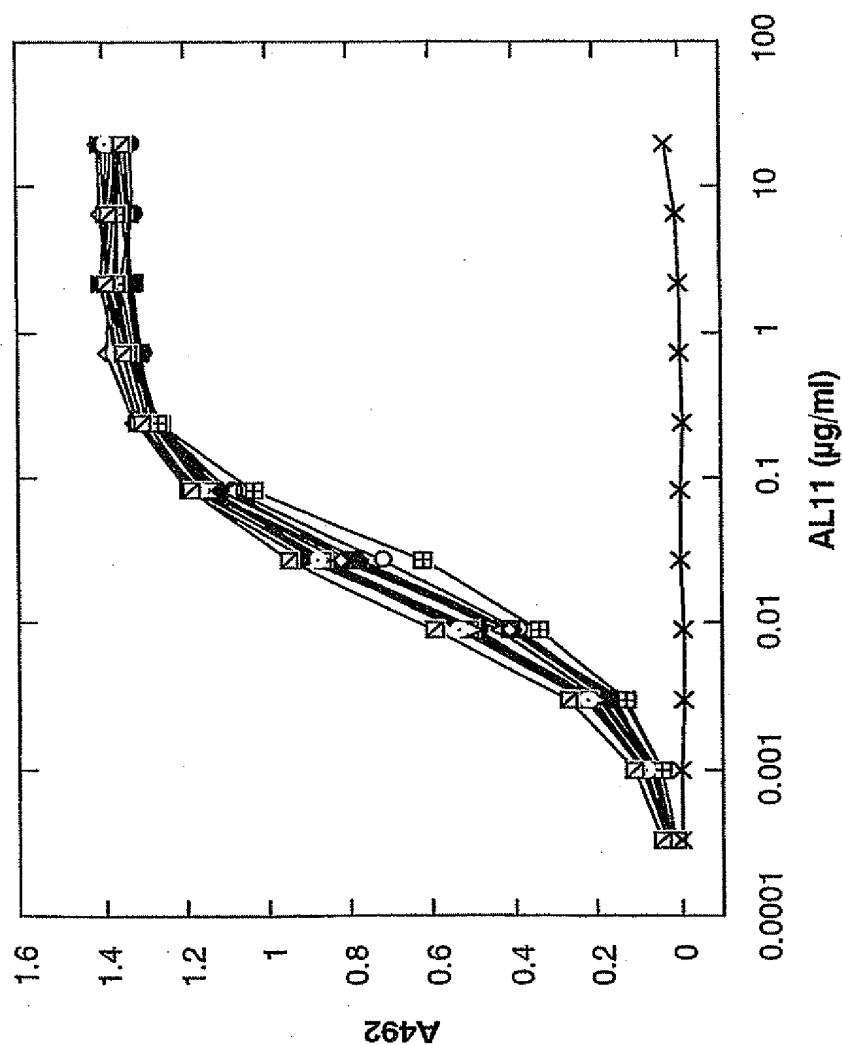
第 1 図



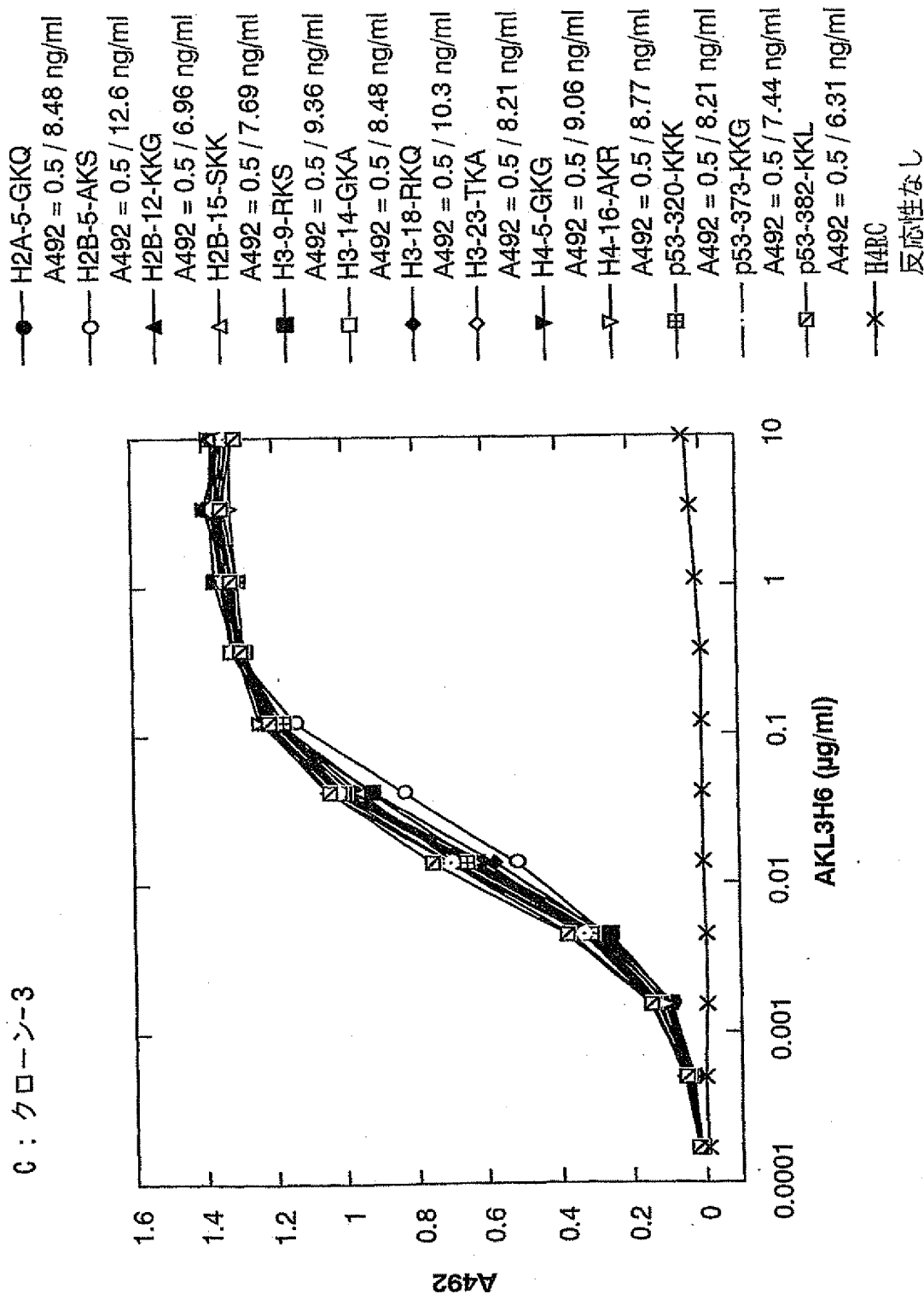
第 1 図 続 前

- H2A-5-GKQ
 A492 = 0.5 / 9.00 ng/ml
 —○— H2B-5-AKS
 A492 = 0.5 / 12.8 ng/ml
 —▲— H2B-12-KKG
 A492 = 0.5 / 8.23 ng/ml
 —△— H2B-15-SKK
 A492 = 0.5 / 10.5 ng/ml
 —■— H3-9-RKS
 A492 = 0.5 / 10.5 ng/ml
 —□— H3-14-GKA
 A492 = 0.5 / 8.32 ng/ml
 —◆— H3-18-RKQ
 A492 = 0.5 / 11.9 ng/ml
 —◇— H3-23-TKA
 A492 = 0.5 / 10.5 ng/ml
 —▼— H4-5-GKG
 A492 = 0.5 / 7.69 ng/ml
 —▽— H4-16-AKR
 A492 = 0.5 / 8.65 ng/ml
 —田— p53-320-KKK
 A492 = 0.5 / 16.3 ng/ml
 —...— p53-373-KKG
 A492 = 0.5 / 7.69 ng/ml
 —□— p53-382-KKL
 A492 = 0.5 / 6.31 ng/ml
 —×— H4RC
 反応性なし

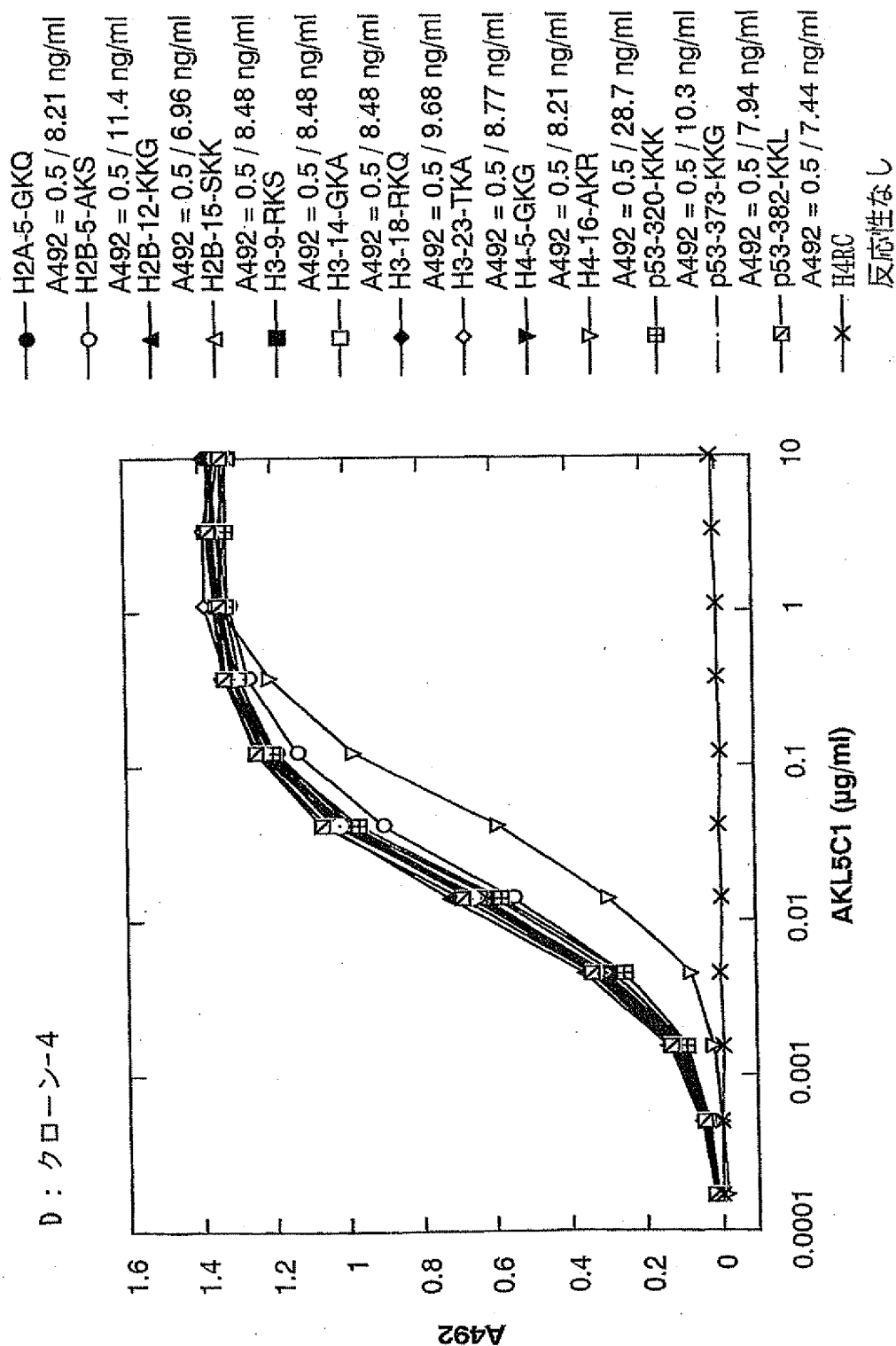
B : クローム-2



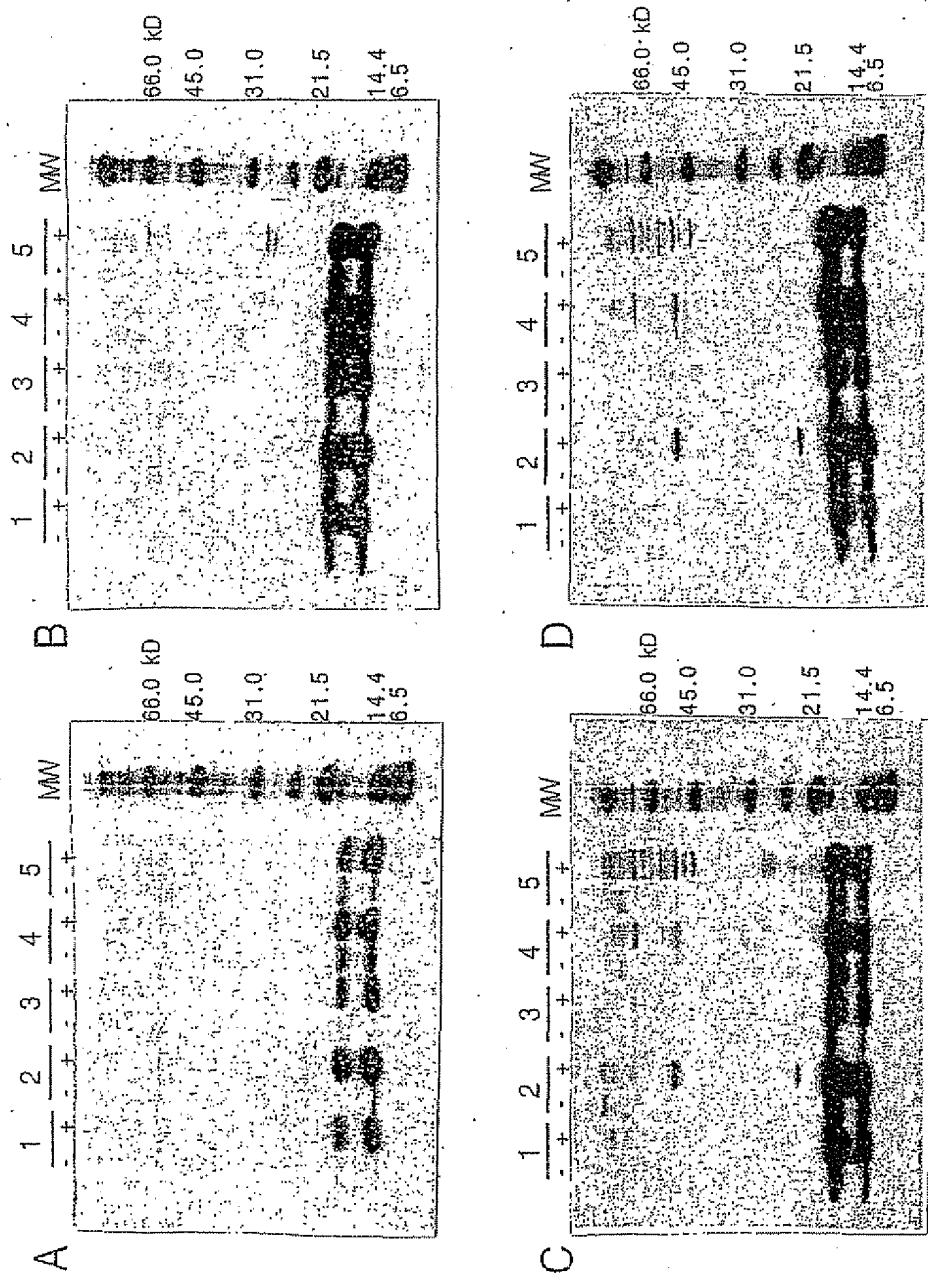
第 1 図 競 味



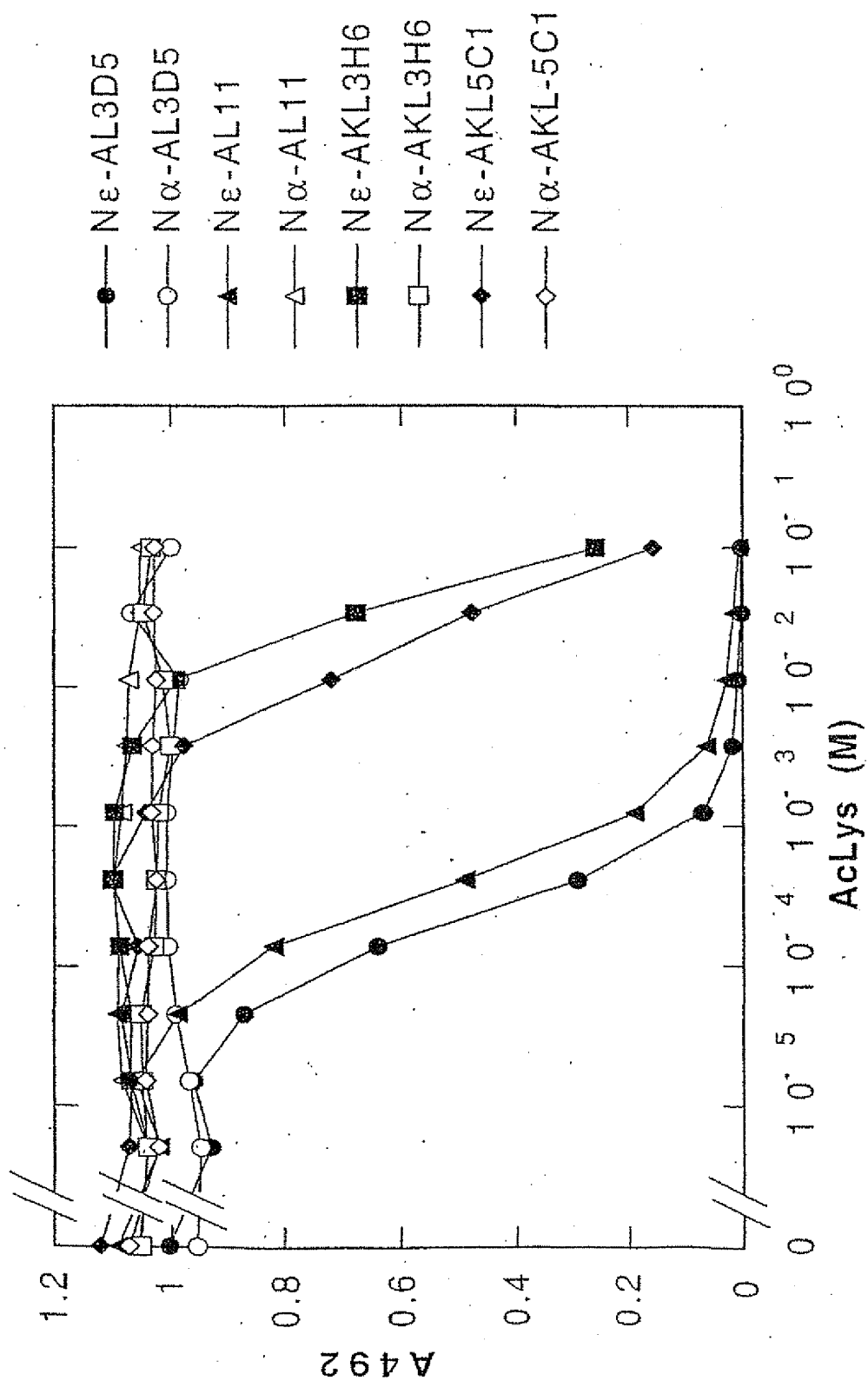
第 1 図 続 成



第 2 図



第 8 図



第 4 図

重鎖

ク□-1-1
ク□-1-2
ク□-1-3
ク□-1-4
1/2/3/4配列

1
1
1
1
1

QVQLQQSGAELVRPQTSVKMSCKAAGYTFETNNHWIGWVKQRPGHGLEWIGDLYPESGYSYNNERFKSKAFLTADPSSSTAYMQLSLTSED^{SAIYY}
QVQLQQSGAELVRPQTSVKMSCKAAGYTFETNNHWIGWVKQRPGHGLEWIGDLYPESGYSYNNERFKSKAFLTADPSSSTAYMQLSLTSED^{SAIYY}
QVQLQQSGAELVRPQTSVKMSCKAAGYTFETNNHWIGWVKQRPGHGLEWIGDLYPESGYSYNNERFKSKAFLTADPSSSTAYMQLSLTSED^{SAIYY}
QVQLQQSGAELVRPQTSVKMSCKAAGYTFETNNHWIGWVKQRPGHGLEWIGDLYPESGYSYNNERFKSKAFLTADPSSSTAYMQLSLTSED^{SAIYY}

CDR2

CDR1

ク□-1-1
ク□-1-2
ク□-1-3
ク□-1-4
1/2/3/4配列

96
96
96
96
96

CARSDEYGC--SWFAFWGQGTLVTSAAKTTTPSVYPLAPGSAQAQTNSMVTLGCIYKGYFDEPVTVRWNSGS
CARAGNRG--AWFAFWGQGTLVTSAAKTTTPSVYPLAPGSAQAQTNSMVTLGCIYKGYFDEPVTVRWNSGS
CCYGC-IGS--AWFAFWGQGTLVTSAAKTTTPSVYPLAPGSAQAQTNSMVTLGCIYKGYFDEPVTVRWNSGS
CVRSYFADGFAWFAFWGQGTLVTSAAKTTTPSVYPLAPGSAQAQTNSMVTLGCIYKGYFDEPVTVRWNSGS

CDR3

軽鎖

ク□-1-1
ク□-1-2
ク□-1-3
ク□-1-4
1/2/3/4配列

1
1
1
1
1

DAVMTQTELSLPVSLGQDQASISCRSSQSLSNSNGNTDLNNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRPSGVLDKPSGSGSCTDFTLKI SRVEAE^{DHGVYF}CLQ
DAVMTQTELSLPVSLGQDQASISCRSSQSLSNSNGNTDLNNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRPSGVLDKPSGSGSCTDFTLKI SRVEAE^{DHGVYF}CLQ
DAVMTQTELSLPVSLGQDQASISCRSSQSLSNSNGNTDLNNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRPSGVLDKPSGSGSCTDFTLKI SRVEAE^{DHGVYF}CLQ
DAVMTQTELSLPVSLGQDQASISCRSSQSLSNSNGNTDLNNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRPSGVLDKPSGSGSCTDFTLKI SRVEAE^{DHGVYF}CLQ

CDR2

CDR1

ク□-1-1
ク□-1-2
ク□-1-3
ク□-1-4
1/2/3/4配列

96
96
96
96
96

VRHVPWTFGGGTKLEIKRADAAAPTAVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLINNFPKDIINVKWKIDGSEKQNGVLNS
VRHVPWTFGGGTKLEIKRADAAAPTAVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLINNFPKDIINVKWKIDGSEKQNGVLNS
VRHVPWTFGGGTKLEIKRADAAAPTAVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLINNFPKDIINVKWKIDGSEKQNGVLNS
VRHVPWTFGGGTKLEIKRADAAAPTAVSIFPPSSSEQLTSGGASVVCFLINNFPKDIINVKWKIDGSEKQNGVLNS

CDR3

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<110> JAPAN ENERGY CORPORATION

<120> A monoclonal antibody for N^ε-acetyl-lysine and a method for
preparation thereof

<130> JA900439

<150> JP 2001-074263

<151> 2001-03-15

<160> 26

<210> 1

<211> 57

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 1

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser

1 5 10 15

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn

20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser

35 40 45

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser

50

55

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 2

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser

20

25

30

Asn Gly Asn Thr Asp Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu

50

55

60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val

85

90

95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp

100

105

110

<210> 3

<211> 54

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser

1

5

10

15

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val

20

25

30

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

35

40

45

Thr Trp Asn Ser Gly Ser

50

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His

20

25

30

Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 5

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asp Gly Thr Thr Asp Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Glu Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

<210> 6

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 6

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Lys Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Phe Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val

85 90 95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu

100 105 110

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 7

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 100 105 110

<210> 8

<211> 110

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Ala Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110

<210> 9

<211> 109

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Asp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ile Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Cys Tyr Gly Tyr Gly Gly Ala Trp Phe Ser Tyr Trp Gly
 100 105

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 10

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1

5

10

15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Phe Tyr Tyr Cys

85

90

95

Val Arg Ser Tyr Phe Ala Asp Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

100

105

110

<210> 11

<211> 501

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 11

gatgctgiga tgacccaaac tccactctcc ctgccigtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgcg ggtctagtcg gagccttgaa aacagtaatg gaaacaccga tttgaactgg 120
 tacctccaga aaccaggcca gctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc tagacagggt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggcagagga ttggggagtt tatttctgcc tccaagttaac acaigtcccg 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggac atcaaacggg ctgaigtgc accaactgta 360
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgctcagc cgtgtgcttc 420
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtggg agattgatgg cagtgaacga 480
 caaaatggcg tctgaacag t 501

<210> 12

<211> 501

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 12

gatgcctgca tgaccctaac tccactctcc ctgctctgca gctctggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgcg ggtctagtcg gagccttgaa aacagtatg gaaccaccga tttgaactgg 120
 tacctccaga aaccaggcca gctccacag ctctgatct acagggtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc tagacagggt cagtggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggcagagga attgggagtt tatttctgcc tccaagttaac acaigtcccg 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgaigtgc accaactgta 360
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgctcagc cgtgtgcttc 420
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtggg agattgatgg cagtgaacga 480
 caaaatggcg tctgaacag t 501

<210> 13

<211> 501

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 13

```
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgacctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca ggtctagta gagccttgaa aaaagtaatg gaaacacctt tttgaactgg 120
tatttccaga aaccaggcca gtctccacag ctcttgatct acagggtttc caaccgattt 180
tciggggtcc tagacagggt caciggtagt ggatcaggga cagatttcac attgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttigggagtt tatttctgcc tccaagttaac acatgtcccg 300
tggaagtctg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtggg agattgatgg cagtgaacga 480
caaaatggcg tctgaacag t 501
```

<210> 14

<211> 501

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 14

```
gatgctgtga tgacccaaac tccactctcc ctgtctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca ggtctagta gagccttgaa aacagtaatg gaaacacctt tttgaactgg 120
tacctccaga aaccaggcca gtctccacag ctcttgatct acagggtttc caaccgattt 180
tciggggtcc tagacagggt cagiggtagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga ttigggagtt tatttctgcc tccaagttaac acatgtcccg 300
tggaagtctg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtggg agattgatgg cagtgaacga 480
```


caaaatggcg tccigaacag t

501

<210> 15

<211> 492

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 15

caggiccagc igcagcagtc tggagctgag ttggtaaggc ctgggacttc agtgaagaatg 60
tccigcaagg ctgctggata cacccttact aaccactgga taggttgggt aaagcagagg 120
ccigggacaatg gccttgagtg gattggagat atttaccctg gaagtgggtt tactaactac 180
aalgagaagt tcaagggcaa ggccacacig acigcagaca catectccag cacagcctac 240
aigcagctca gcagcctgac atcigaggac tctgcatct attactgtgc aagatccgat 300
tactacgggt cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt cctgcagacc 360
aaaacgacac ccccatctgt ctatccacig gcccctggat ctgctgcca aactaactcc 420
atggigaccc tgggatgcct ggtcaagggc tatitccctg agccagtgc agtgacctgg 480
aacctcggat cc 492

<210> 16

<211> 492

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 16

caggiccagc igcagcagtc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagaatg 60
tccigcaagg ctgctggata cacccttact aaatactgga taggttgggt aaagcagagg 120
ccigggacaatg gccttgagtg gattggagat atttaccctg gaagtgggtt tactaactac 180

```

aatgagaaat tcaagggcaa ggccaaactg actgcagacc cticcaccac cacagcctac 240
ctgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgccatct attactgtgc aagagcggga 300
aattacggcg cctgggttgc ttactggggt caagggactc iggtcacgtg ctctgcagcc 360
aaaacgacac ccccatctgt ctatccactg gcccctggat ctgctgcca aactaactcc 420
atggtagacc tgggaigcct ggtcaagggc tatctccctg agccagtgc agtgacctgg 480
aacctctggat cc 492

```

<210> 17

<211> 489

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 17

```

caggaccagc tgcagcagtc tggagctgag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagaig 60
tcttgcaagg ctgcaggata caccitcact aagtattgga taggttgggt taagcagagg 120
cciggacaig gccctgagtg gattggagat atttaccctg caggtaggta tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacacig actgcagaca catcctccag cacaatctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgccatct attactgttg ctatgggtac 300
ggcggggcct ggttttctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgcagccaaa 360
acgacacccc catctgtcta tccactggcc cctggatctg ctgcccacac taactccatg 420
gtgaccttgg gatgcctggg caagggtat ticcctgagc cagtgacagt gacciggaac 480
tctggatcc 489

```

<210> 18

<211> 498

<212> DNA

<213> MOUSE

<400> 18

caggteccaac tgcagcagtc tggagcigag ctggtaaggc ctgggacttc agtgaagaig 60
 tectgcaagg ctgctggata caccitcact aactactgga taggttgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg accttgagtg gattggagat aittacctg gaagtggita tgccttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca catcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgccttct attactgtgt aagatcctac 300
 ttcgctgatg gcccggcctg gtttgcctac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
 gcagccaaaa cgacaccccc atctgtctat ccactggccc ctggatctgc tgcccaaact 420
 aactccatgg tgacctggg atgcctggtc aagggtatt tccctgagcc agtgacagtg 480
 acctggaact ctggatcc 498

<210> 19

<211> 167

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 19

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Asp Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 165

<210> 20

<211> 167

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 20

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asp Gly Thr Thr Asp Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Glu Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 165

<210> 21

<211> 167

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 21

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Lys Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Phe Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu
 50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 165

<210> 22

<211> 167

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 22

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Leu

50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Leu Gln Val
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
 165

<210> 23

<211> 164

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn His
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser

<210> 24

<211> 164

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Asp Pro Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Gly Asn Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser

<210> 25

<211> 163

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
 20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ile Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Cys Tyr Gly Tyr Gly Gly Ala Trp Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ser

<210> 26

<211> 166

<212> PRT

<213> MOUSE

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30
Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Asp Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Tyr Ala Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Phe Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Ser Tyr Phe Ala Asp Gly Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160
Thr Trp Asn Ser Gly Ser
165

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/02330

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/13, C07K16/44, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C07K16/00-16/46, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	WHITE D. A. et al., Preparation of Site-Specific Antibodies to Acetylated Histones. METHODS 1999, Vol.19, No.3, pages 417 to 424	<u>1-2,12-15</u> 3-11
<u>X</u> A	HEBBES T. R. et al., A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. EMBO J. 1988, Vol.7, No.5, pages 1395 to 1402	<u>1-2,12-15</u> 3-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April, 2002 (23.04.02)

Date of mailing of the international search report

14 May, 2002 (14.05.02)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/13, C07K 16/44, C12P 21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C07K 16/00-16/46, C12P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	WHITE D. A. et al. Preparation of Site-Specific Antibodies to Acetylated Histones. METHODS 1999, Vol. 19, No. 3, p. 417-424	<u>1-2, 12-15</u> 3-11
<u>X</u> A	HEBBES T. R. et al. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. EMBO J. 1988, Vol. 7, No. 5, p. 1395-1402	<u>1-2, 12-15</u> 3-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 04. 02

国際調査報告の発送日

14.05.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)